

**A TRANSFORMANT E. COLI SS373 AND THE METHOD OF PRODUCING
SUCCINIC ACID THEREFROM**

AD

Patent number: KR267505
Publication date: 2000-10-16
Inventor: PAN JAE GU (KR); SHIN SOO AN (KR); PARK CHAN
KYU (KR); CHANG DONG EUN (KR); KIM JAE EUN
(KR); KIM PIL (KR)
Applicant: KOREA INST SCIENCE TECHNOLOGY (KR)
Classification:
- **international:** C12N1/20; C12N1/20; (IPC1-7): C12N1/20
- **european:**
Application number: KR19980031193 19980731
Priority number(s): KR19980031193 19980731; KR19970036590 19970731

[Report a data error here](#)

Abstract not available for KR267505

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

공고특허10-0267505

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. 6
C12N 1/20

(45) 공고일자 2000년10월16일
(11) 공고번호 10-0267505
(24) 등록일자 2000년07월05일

(21) 출원번호	10-1998-0031193	(65) 공개번호	특1999-0014331
(22) 출원일자	1998년07월31일	(43) 공개일자	1999년02월25일
(30) 우선권주장	1019970036590	1997년07월31일	대한민국(KR)
(73) 특허권자	한국과학기술연구원 박호군 서울특별시 성북구 하월곡동 39-1		
(72) 발명자	반재구 대전광역시 유성구 갑동 계룡빌라 비동 101호 신수안 대전광역시 유성구 전민동 삼성푸른아파트 103동 1202호 박찬규 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 122동304호 장동은 대전광역시 유성구 도룡동 주공아파트 2동 408호 김재은 대전광역시 유성구 신성동 137동 11호 김필 대전광역시 유성구 궁동 다솔아파트 102동 805호		
(74) 대리인	백남훈 허상훈		

심사관: 최규환

(54) 형질전환 대장균 SS373 및 이를 이용한 숙신산의생산방법

요약

본 발명은 형질전환 대장균(Escherichia coli) SS373 및 이를 이용한 숙신산의 생산방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 유전공학기술을 이용하여 대사경로를 조작함으로써 초산 및 젖산 생성경로를 유전적으로 결손시킨 신균주 대장균 SS373 및 이 균주를 호기적 조건에서 1차 성장시킨 후, 숙신산 생산단계에서는 2차적으로 배양조건을 혐기적 조건으로 전환시켜 배양함으로써, 보다 효율적으로 그리고 보다 높은 수율로 숙신산을 생산하는 방법에 관한 것이다.

대표도

도2

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 대장균 SS373의 탄소원에 따른 숙신산 생산 경로를 나타낸 개략도,
 도 2는 본 발명에 따라 대장균 SS373을 이용하여 숙신산 생산 결과를 나타낸 그래프.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야 종래기술

본 발명은 형질전환 대장균(*Escherichia coli*) SS373 및 이를 이용한 숙신산의 생산방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 유전공학기술을 이용하여 대사경로를 조작함으로써 초산 및 젖산 생성경로를 유전적으로 결손시킨 신균주 대장균 SS373 및 이 균주를 호기적 조건에서 1차 성장시킨 후, 숙신산 생산단계에서는 2차적으로 배양조건을 혐기적 조건으로 전환시켜 배양함으로써, 보다 효율적으로 그리고 보다 높은 수율로 숙신산을 생산하는 방법에 관한 것이다.

숙신산은 일반적으로 생명체의 기본 대사물질로서 구연산회로(TCA)의 중간체이며, 혐기성 호흡을 하는 일부 미생물에서는 최종 대사산물의 하나로 생산되기도 한다. 이러한 숙신산은 유기합성 단량체의 전구물질로서, 보통은 석유화학 공정 중의 탄화수소로부터 생산되는 1,4-부탄디올, 테트라히드로퓨란, 감마부티로락톤 등의 유기합성 단량체로 전환 가능하며, 또한 식품과 화장품의 첨가제 등으로 이용되기도 한다.

종래에 숙신산을 생산하는 방법으로는 화학적 방법 또는 생물학적 방법 등이 있으나 환경친화적인 생물학적 방법에 대한 요구가 증가할 것으로 예상되며, 특히 환경비용 등을 고려할 때 폐기생물자원 등에서 얻을 수 있는 값싼 탄수화물로부터 미생물을 이용한 생물공정을 통해 보다 효율적인 방법으로 숙신산을 생산할 수 있는 방법에 대한 연구가 시도되고 있다. 이러한 미생물을 이용한 숙신산의 생산은 주로 미국의 미시간 생물공학연구소(MBI)에 의해 연구되어져 왔는데, 일례로서 절대 혐기성 세균인 앤에어로비오스피릴럼 숙신프로듀센스(*Anaerobiospirillum succiniproducens*)를 이용한 공정이 이미 개시되어 있다[미합중국 특허 제 5,573,931 호, 제 5,521,075 호 및 제 5,504,004 호]. 그러나, 이러한 절대 혐기성 세균은 복잡한 영양요구성을 가지며 느린 성장속도를 보인다. 또한 절대 혐기성 조건을 항상 유지해야 하기 때문에 연구의 어려움과 함께 생산공정의 제한요인이 될 수 있는 문제점이 있다[Holt J. G., et. al., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 9th ed., 293, Williams & Wilkins(1994)].

발명이 이루고자하는 기술적 과제

본 발명의 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 통기성인 대장균을 유전공학적으로 조작하여 형질전환 대장균을 제조하고, 또한 상기 형질전환된 대장균이 높은 생산성으로 숙신산을 생산함을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 새로운 대사경로를 갖는 형질전환 대장균을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 대장균을 이용하여 생산성이 개선된 숙신산 생산방법을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 형질전환 대장균(*Escherichia coli*) SS373을 그 특징으로 한다.

또한, 본 발명은 상기 대장균 SS373을 적합한 탄소원이 함유된 배양액에서 호기적 조건으로 배양하는 세포 성장과정; 그리고 배양조건을 혐기적 조건으로 전환하여 배양하는 숙신산 생산과정을 포함하는 숙신산 생산방법을 그 특징으로 한다.

이와 같은 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명은 유전공학적 조작방법을 통하여 형질전환된 신균주 대장균 SS373 및 이를 이용하여 숙신산을 보다 효율적으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 형질전환된 대장균을 이용하는 방법에 관한 것으로, 우선 본 발명과 관련된 대장균의 일반적인 특성에 대해 살펴보면 다음과 같다[Holt J. G., et. al., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 9th ed., 179, Williams & Wilkins(1994)].

대장균은 영양요구성이 간단하고, 약 20분의 생장주기를 갖고 있어 생육이 빠르며, 최적온도 37°C, pH 7.0, 그람-음성의 중속영양생물로서, 어닐린 염료에 잘 염색되며, 또한 단일세포 또는 세포쌍으로 존재하는 끝이 둥근 단간균형태를 지닌다. 특히 대장균은 포도당을 기질로 한 혐기성 성장시 초산, 젖산, 포름산, 숙신산, 알코올을 생산하는 혼합산-발효형(mixed acid-fermentation type) 장내세균이다[Stanier R. Y., et. al., The Microbial World, 5th ed., 439 ~ 452(1986)].

또한, 대장균은 호기성 성장은 물론 상기된 바와 같이 혐기성 성장도 가능케 하는 대사잠재력을 갖는 통기성 미생물이다.

상기와 같은 유용한 대사능력과 함께, 대장균은 생리학적 및 유전학적 연구가 가장 많이 되어 있는 생물체이고, 이에 따른 대사조절이 용이하고 대사공학의 결과를 쉽게 예측할 수 있으며, 또한 유전공학적 조작에 따른 재조합 균주의 생산 및 대사공학 기술을 아주 쉽게 적용할 수 있는 장점이 있다.

[숙신산의 대량생산 방법]상기에서 살핀 대장균의 일반적 특성으로 보건데, 대장균을 이용한 숙신산-생산 최적화 조건으로는 1차적으로 균주자체를 유전적으로 개량하는 방법과 2차적으로 배양조건 등의 외부환경적인 조건을 변화시키는 방법 등을 고려할 수 있는 바, 본 발명에서는 상기 두 방법을 모두 채용하여 숙신산을 대량생산한다.

우선, 대장균을 유전적으로 개량하는 방법으로서 숙신산 대사경로를 변화시키는 것이다. 이는 대장균의 특성에서 살핀 바와 같이 대장균은 포도당을 기질로 한 혐기성 성장시 초산, 젖산, 포름산, 숙신산, 알코올을 생산하는 혼합산 발효형태(mixed acid-fermentation type)를 나타내기 때문에, 숙신산만을 보다 효율적으로 생산하기 위해서는 숙신산 이외의 발효산물 생성경로를 유전적으로 차단하여 대사흐름을 기질로부터 숙신산 생성경로쪽으로 유도해야 한다. 즉, 혐기성 조건하에서 대사흐름을 초산 및 젖산대사로 흐르는 것을 차단하기 위하여, 이 경로를 조절하는 각각의 효소들을 암호화하고 있는 유전자를 블록시켜 형질전환체를 유도한다.

두 번째 방법으로 본 발명에 따른 대장균은 통기성으로 호기성 조건과 혐기성 조건하에서 모두 생장 가능하고, 숙신산은 혐기성 조건하에서 발효산물로 생산되므로 숙신산 생산을 최적화하는 방법으로는 미생물 생장과정 및 숙신산 생산과정을 분리하여 배양시키는 것이다. 즉, 미생물 생장과정에 의하여 호기성조건하에서 미생물을 배양시킴으로써 보다 빠른 시간내에 생산균주를 대량으로 생산한 다음, 숙신산을 생산하기 위해 배양조건을 혐기성으로 전환시킨다.

이렇게 생산된 숙신산은 배양액과 평형상태를 유지할 때까지 대장균 세포막을 투과하여 나오므로 본 발명에 따른 대장균 SS373의 세포내에 숙신산의 축적을 방지할 수 있어서 세포내 피이드백 조절을 피하면서 숙신산을 대량으로 생산할 수 있다. 이상에서 생산되어 배양액내에 축적된 숙신산은 전기투석방법을 통하여 고순도의 숙신산으로 회수될 수 있다[Hongo M. et. al., Appl. Environ. Microbiol., 52, 2, 314 ~ 319(1986)].

[이중 형질전환 대장균의 제조]상기에서 살핀 바와 같이, 대장균의 혐기성 대사특성에서 보건데 숙신산만을 대량생산하기 위해서는 숙신산 이외의 발효산물 생성경로를 유전적으로 결손시켜 대사흐름을 기질로부터 숙신산 생성경로쪽으로 유도해야 한다. 즉, 초산 생성경로와 젖산 생성경로를 유전적으로 결손시킨 이중 형질전환 균주를 개발하여야 하는 바, 그 방법은 다음과 같다.

본 발명의 이중 형질전환 대장균의 제조는 실하비 등이 제시한 방법에 의거하여 다음과 같이 실시한다[Silhavy, T. J., et al., Experiments with gene fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1984)].

형질도입된 P1 파아지의 준비본 발명에 있어서 숙신산 생산균의 모균인 대장균의 포스포트랜스아세틸라제를 암호화하는 유전자인 pta 자리에 Tn10-lacZ 트랜스포존이 삽입된연변이(pta::Tn10-lacZ-1)된 형질공여균주 및 D-젖산 탈수소화효소를 암호화하는 유전자 ldhA를 가나마이신 내성유전자의 삽입을 통해 불활성화시킨 대장균을 사용하여 각각의 pta::Tn10-lacZ-1 유전자를 갖는 P1 파아지 용균액과 ldhA::km 유전자를 갖는 P1 파아지 용균액을 수득한다.

::Tn으로 형질도입된 P1 파아지를 이용한 형질수용균주의 1차 형질전환형질수용균주로서의 대장균에 상기 형질공여균주로부터 얻은 pta::Tn10-lacZ-1 유전자를 갖는 P1 파아지 용균액을 감염시킨 다음, 테트라사이클린이 첨가된 LB 평판배지에 도말하여 콜로니 형성을 관찰함으로써, pta::Tn10-lacZ-1으로 1차 형질전환된 대장균을 선별한다.

으로형질도입된 P1 파아지를 이용한 형질수용균주의 2차 형질전환상기 제 2 단계에서 수득한 pta::Tn10-lacZ-1으로 1차 형질전환된 대장균을 형질수용균주로 이용하여 상기 제 1 단계에서 수득한 ldhA::km 유전자를 갖는 P1 파아지 용균액을 감염시켜 가나마이신이 첨가된 LB 평판배지에 도말하여 콜로니 형성을 관찰함으로써 이중 형질전환체 대장균 pta::Tn10-lacZ-1 ldhA::km를 선별한다.

[이중 형질전환 대장균에서의 다양한 탄소원에 따른 숙신산 생산원리]도 1에 나타난 것처럼 탄소원에 따라 운반경로 및 숙신산까지의 대사경로가 다르다. 한편, 상기 탄소원에 관계없이 인산화 과정이 발생하는 공통점이 있는 바, 포도당은 PTS(Phosphotransferase System)로 알려진 운반 시스템을 통해 주로 균주내로 이동되며, 이때 인산화의 인산기 공여체는 PEP(Phosphoenolpyruvate)가 주종을 이룬다고 알려져 있다. 상기 인산화에 관여한 PEP는 피루브산으로 전환되므로 대사경로상 숙신산으로 전환될 기회가 상대적으로 감소하게 된다. 반면, 맥아당, 갈락토오스 및 크실로오스는 ATP에 의해 인산화가 일어나므로 포도당에 비해 숙신산으로 전환될 수 있는 PEP를 절약할 수 있다. 따라서, PEP를 탄소원 운반시 필요로 하는 인산화에 사용하지 않게 되면 숙신산 생산이 더욱 증가할 뿐만 아니라 다른 부산물 생성도 동시에 억제할 수 있다.

이하 본 발명을 실시예에 의거 더욱 상세히 설명하겠는 바, 본 발명이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 이중 형질전환 대장균의 제조본 발명의 이중 형질전환 대장균의 제조는 실하비 등이 제시한 방법에 의거하여 다음과 같이 실시하였다[Silhavy, T. J., et al., Experiments with gene fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1984)].

형질도입된 P1 파아지의 준비본 발명에 있어서 숙신산 생산균의 모균인 E. coli W3110[Genetic stock center collection number(CGSC) 4474]의 포스포트랜스아세틸라제를 암호화하는 유전자인 pta 자리에 Tn10-lacZ 트랜스포존이 삽입돌연변이(pta::Tn10-lacZ-1)된 형질공여균주[CP993; Shin S. and C. Park, J. Bacteriol., 177, 4696 ~ 4702(1995)]를 3 Mℓ TGC배지(0.1% 포도당 및 10 mM 염화칼슘을 포함하는 락토-트리톤 배지)에 하룻밤 배양하고, 이어 상기 배양액을 다시 3 Mℓ TGC배지에 1% 접종하여 35°C에서 1시간 정도 재배양하였다. 그런 다음, 상기 재배양액의 600 nm에서의 흡광도가 0.1이 되면 10

¹⁰ pfu/Mℓ의 P1 파아지를 30 Mℓ 첨가하고 2 ~ 3시간 더 배양하였다. 배양액이 파아지에 의해 용균되면 0.1 Mℓ 클로로포름을 넣고 혼합한 뒤, 원심분리하여 P1 파아지 용균액(lysate)으로 구성된 상층액만을 수집하여 pta::Tn10-lacZ-1 유전자를 갖는 P1 파아지 용균액을 수득하였다.

ldhA::km 유전자를 갖는 P1 파아지 용균액을 얻기 위하여 상기 방법과 동일하게 실시하였으며, 이때 형질공여균주로서는 D-젖산 탈수소화효소를 암호화하는 유전자 ldhA를 가나마이신 내성유전자의 삽입을 통해 불활성화시킨 E. coli W3110[NZN117; Bunch P. K., et. al., Microbiology, 143, 187 ~ 195(1997)]를 사용하였다.

::Tn으로 형질도입된 P1 파아지를 이용한 형질수용균주 의 1차 형질전환우선, 형질수용균주로서의 대장균 W3110[Genetic stock center collection number(CGSC) 4474]을 LB배지에서 하룻밤 배양하고, 원심분리하여 세포를 취한 다음, 이 세포를 배양액 부피의 절반인 10 mM 황산마그네슘 및 5 mM 염산칼슘용액에 현탁하였다. 이렇게 준비한 형질수용균주를 0.1 Mℓ씩 4개의 소형 원심분리튜브에 담고, 각 튜브에 상기 형질공여균주로부터 얻은 pta::Tn10-lacZ-1 유전자를 갖는 P1 파아지 용균액을 각각 0 Mℓ, 0.01 Mℓ, 0.05 Mℓ, 0.1 Mℓ씩 넣고 혼합한 뒤 상온에서 15분간 방치하여 감염시켰다. 이어, 상기 각각의 혼합물에 1 M 구연산나트륨용액을 0.1 Mℓ씩 넣어 혼합하고 원심분리한 다음, 상층액을 버리고 1 Mℓ의 0.01 M 구연산나트륨용액으로 2회 세척하였다. 그런 다음, 다시 원심분리하여 세포를 수집하고, 수집된 세포를 0.9 Mℓ LB배지 및 0.1 Mℓ 0.01 M 구연산나트륨용액으로 현탁하였으며, 이어 35°C에서 1시간동안 배양하였다. 그리고 나서, 상기 배양액을 13 µg/Mℓ 테트라사이클린이 첨가된 LB 평판배지에 도말하여 콜로니 형성을 관찰함으로써, pta::Tn10-lacZ-1으로 1차 형질전환된 대장균 W3110을 선별하였다.

으로형질도입된 P1 파아지를 이용한 형질수용균주의 2차 형질전환상기 제 1 단계에서 수득한 ldhA::km 유전자를 갖는 P1 파아지 용균액 및 상기 제 2 단계에서 수득한 pta::Tn10-lacZ-1으로 1차 형질전환된 대장균 W3110을 형질수용균주로 이용하여, 상기 제 2 단계와 동일한 방법으로 20 µg/Mℓ 가나마이신이 첨가된 LB 평판배지에 도말하여 콜로니 형성을 관찰함으로써 이중 형질전환제 W3110 pta::Tn10-lacZ-1 ldhA::km를 제조하였다.

이에, 상기 제 3 단계에서 최종적으로 선별된 이중 형질전환체를 대장균(Escherichia coli) SS373로 명명하고, 이를 대한민국 기탁기관이며, 부다페스트조약에 의한 국제기탁기관인 한국과학기술원 생명공학연구소내 유전자원센터에 1997년 7월 28일자로 기탁하고, 기탁번호 KCTC 8818P를 부여받았다.

한편, 본 발명의 대장균 SS373은 혐기성 조건에서는 성장하지 못한다고 알려진 대장균 NZN 111[E. coli pfl ldhA 이중 돌연변이체; D. P. Clark, FEMS Microbiol. Rev., 63, 223 ~ 234(1989)]과는 다르게 대사경로중 아세틸-코에이의 생성이 가능하기 때문에 혐기 조건에서도 포도당을 이용하여 대사가 진행되어 생장이 가능함을 확인할 수 있었다.

실시예 3: 포도당 배지에서의 숙신산 생산방법실시예 1에서 제조된 초산-젖산 생성능이 결핍된 대장균 SS373(KCTC

8818P)을 다음 표 1의 배지성분 및 함량을 이용하여 종배양과 본배양을 실시하였다.

[표1]

성분	포도당	제일인산 나트륨	제이인산 나트륨	효모추출물	탄산나트륨
농도(g/l)	15	7	3	5	3.13

실시에 1의 평판배지에서 생장시킨 균주를 5 Mℓ 액상배지에 접종하여 37°C에서 호기적 조건으로 하룻밤 동안 종배양한 후, 250 Mℓ 플라스크에 든 50 Mℓ 액상배지에 재접종하여 600 nm에서 흡광도 0.5까지 균주를 1차 스케일-업하였다. 그런 다음, 1차 스케일-업한 균주를 가지고 본배양을 실시하였는 바, 본배양은 생장과정 및 숙신산 생산과정의 두 과정으로 나누어 수행하였다. 우선은 플라스크에서 키운 상기 종배양 중균액을 1.5 ℓ의 배양액에 접종한 후 3 ℓ 발효배양기를 이용하여 배양온도 37°C, pH 7.0, 또한 배양액의 호기적 조건을 유지하기 위해 교반속도 350 rpm 및 기포발생 속도 1 vvm으로 유지하면서 O.D

600 = 4.0이 될 때까지 대략 8시간 동안 배양하였다.

다음으로 숙신산 생산과정으로서, 상기 호기적 조건하에서 확보한 대량의 생산균주가 함유된 배양배지에 5.0%의 이산화탄소를 연속공급하여 혐기성 조건으로 전환하고, 사용기질로서 30 g의 포도당을 500 Mℓ의 증류수에 용해하여 추가적으로 첨가하였다. 그 결과, 34시간 후에 11 g/ℓ의 숙신산을 생산하였으며, 발효 중간산물인 피루브산은 0.8 g/ℓ을 생산하였다[도 2]. 도 2에서 그래프내 직선은 혐기성 조건으로 전환하고, 30 g의 포도당을 추가적으로 첨가한 시점을 나타낸 것이다.

한편, 숙신산과 피루브산의 분리 및 측정은 자외선을 이용한 HPLC를 이용하여 수행하였으며 또한, 포도당의 양은 포도당 분석기[YSU, 미합중국, 2300STAT]를 이용하여 측정하였다.

실시에 4: 다양한 탄소원 배지에서의 숙신산 생산방법본 발명 대장균 SS373(KCTC 8818P)의 숙신산 생산에 미치는 탄소원의 효과를 조사하기 위하여, 실시에 1에서 제조된 초산-젖산 생성능이 결핍된 대장균 SS373(KCTC 8818P) 및 대장균 W3110을 다음 표 2의 배지성분 및 함량을 이용하여 종배양과 본배양을 실시하였다. 포도당 이외에 사용된 탄소원은 포도당과는 다른 대사경로를 갖는 맥아당, 갈락토오스 및 크실로오스이다.

[표2]

성분	탄소원	제일인산 나트륨	제이인산 나트륨	효모추출물	탄산나트륨
농도(g/l)	10	7	3	5	3.13

실시에 1의 평판배지에서 생장시킨 균주 또는 대장균 W3110을 3 Mℓ 액상배지에 접종하여 37°C에서 호기적 조건으로 하룻밤 동안 종배양한 후, 이 배양액을 100 Mℓ 플라스크에 든 10 Mℓ 액상배지에 600 nm에서 흡광도 1.0이 되도록하여 접종하였다. 이어, 상기 플라스크에 5.0% 이산화탄소를 불어 넣은 후 실리콘 마개를 사용하여 혐기상태를 유지하였고, 37°C에서 8시간동안 배양한 다음 배양액중의 유기산 성분을 자외선을 이용한 HPLC로 분리 및 측정하였으며, 그 결과는 다음 표 3에 나타내었다.

[표3]

균주	탄소원	숙신산(g/l)	피루브산(g/l)	젖산(g/l)	아세트산(g/l)
W3110	포도당	0.6	0	1.0	1.0
	맥아당	0.5	0	1.6	1.6
	갈락토오스	2.1	0	0.8	2.3
	크실로오스	1.6	0.2	0.9	1.6
SS373	포도당	2.7	5.3	0	0.6
	맥아당	2.3	1.8	0	0.1
	갈락토오스	1.9	0.6	0	0.3

	크실로오스	1.6	0.4	0	0.4
--	-------	-----	-----	---	-----

상기 표 3에서 확인할 수 있듯이, 본 발명 대장균 SS373(KCTC 8818P)의 경우에는 포도당을 탄소원으로 이용할 때, 숙신산의 약 2배에 해당하는 피루브산이 함께 생산되었으나, 맥아당을 탄소원으로 이용할 때에는 숙신산과 피루브산이 약 1:0.8의 비율로 생산되었으며, 갈락토오스 및 크실로오스를 탄소원으로 이용할 때에는 거의 유일한 발효산물로서 각각 1.9 및 1.6 g/l의 숙신산을 생산하였다. 따라서, PTS에 의해 운반되지 않는 탄소원을 사용하면 최종 생산되는 숙신산의 순도를 개선할 수 있다는 것을 알 수 있으므로 숙신산의 수율 및 순도를 모두 고려하여 PTS에 의해 운반되지 않는 탄소원을 이용하는 것이 바람직함을 알 수 있었다.

한편, 대장균 W3110의 숙신산 생산 수율은 포도당을 탄소원으로 이용하는 경우에는 본 발명의 대장균 SS373(KCTC 8818P)과 비교하여 약 20%, 맥아당을 이용한 경우에는 약 22%밖에 되지 않으므로, 큰 수율의 차이를 나타냄을 알 수 있었다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 이중 형질전환 대장균 SS373(KCTC 8818P)을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 대장균 SS373을 이용한 숙신산 생산방법을 제공한다. 본 발명의 형질전환 대장균 SS373 및 이를 이용한 숙신산 제조방법은 종래의 절대 혐기성 균주를 이용할 경우의 복잡한 영양요구성 문제에 따른 배지선택의 제한과 절대 혐기성조건의 유지에 필요한 노력 및 경비를 줄일 수 있고, 또한 신균주 대장균 SS373의 빠른 성장속도를 이용하여 보다 효율적으로 숙신산을 생산할 수 있는 효과가 있으며, 포도당과 다른 운반 및 대사경로를 갖는 탄소원을 이용하여 다른 부산물 없이 숙신산을 생산할 수 있는 효과가 있다.

(57) 청구의 범위

청구항1

대장균(*Escherichia coli*) SS373(KCTC 8818P).

청구항2

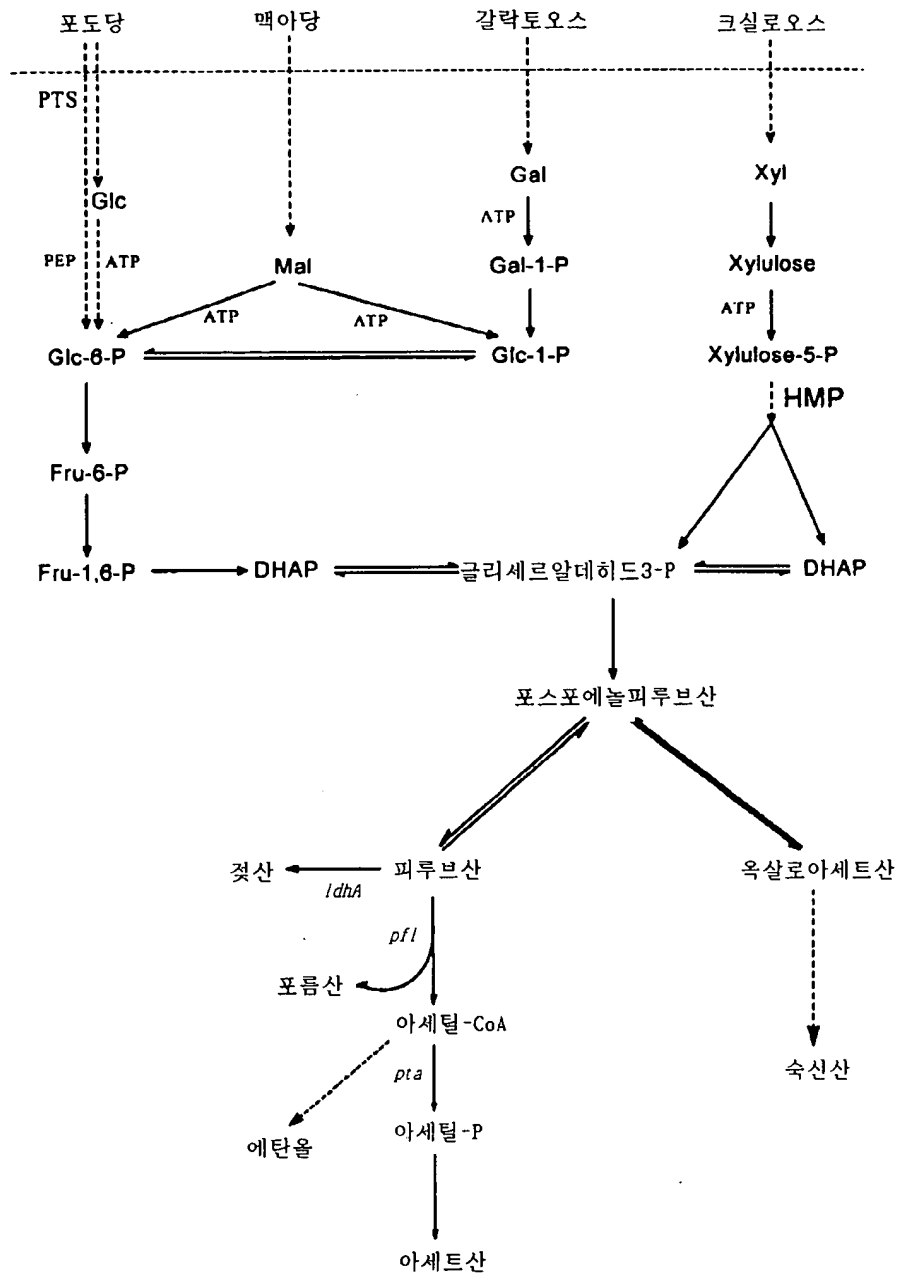
미생물을 적합한 탄소원이 함유된 배양액에서 호기적 조건으로 배양하는 세포 성장과정 및 배양조건을 혐기적 조건으로 전환하여 배양하는 숙신산 생산과정을 포함하는 숙신산 생산방법에 있어서, 상기 미생물은 제 1 항의 대장균 SS373(KCTC 8818P)인 것을 특징으로 하는 숙신산 생산방법.

청구항3

제 2 항에 있어서, 상기 탄소원은 PTS(Phosphotransferase System)에 의해 운반되지 않는 탄소원인 것을 특징으로 하는 숙신산 생산방법.

도면

도면1



도면2

